

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Diferenzas xenéticas ou epixenéticas entre poboacións de *Silene latifolia* sometidas a condicións litorais e continentais?

¿Diferencias genéticas o epigenéticas entre poblaciones de *Silene latifolia* sometidas a condiciones litorales y continentales?

Genetic or epigenetic differences between two populations of *Silene latifolia* under continental and littoral conditions?

Mar García Colomer

Junio, 2017

*Tutor(es) Académico: Alejandro Martínez Abraín
Manuel Pimentel Pereira*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Índice

Resumen/Resumo/Summary

Palabras clave

1.	Introducción.....	1
2.	Objetivos.....	3
3.	Material y métodos.....	4
4.	Resultados.....	11
5.	Discusión.....	18
6.	Conclusiones/ Conclusions.....	20
8.	Agradecimientos.....	23
7.	Bibliografía.....	25

Resumen

La diferenciación morfológica de las poblaciones costeras de diversas especies vegetales ha llevado a la definición de nuevos taxones sin estudiar el mecanismo de dicha diferenciación. En este trabajo de fin de grado estudio la posible relación entre las diferencias fenotípicas de dos subespecies de *Silene latifolia* (*S. latifolia* subsp. *latifolia*, de amplio espectro ecológico, y *S. latifolia* subsp. *mariziana*, propia de acantilados costeros e islas) y los patrones epigenéticos de metilación. Para la realización del estudio se recogieron semillas y hojas de tres poblaciones pertenecientes a ambas subespecies. Las hojas se emplearon para la obtención de DNA mientras que las semillas se plantaron bajo condiciones comunes. Los estudios filogenéticos y de volumen de DNA realizados descartaron el papel de la genética como causante de las diferencias entre las dos subespecies de *S. latifolia*. Sin embargo, el análisis morfométrico de las plantas cultivadas indicó que las diferencias morfológicas se mantienen en la F1 en jardín común lo que sugiere un papel de la herencia genética o de la herencia epigenética a largo plazo, si bien descarta que las diferencias sean debidas a plasticidad fenotípica. El análisis epigenético se realizó empleando la técnica de amplificación de polimorfismos sensible a metilación (MSAP). Esta técnica permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre los patrones de metilación de plántulas de las dos especies criadas en invernadero y entre adultos de *S. latifolia mariziana* y sus descendientes, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón global de metilación entre adultos reproductores de los dos morfos. Si bien el método ha sido exitoso detectando diferencias en patrones de metilación, en el futuro será necesario utilizar un mayor tamaño muestral y mejorar la aproximación epigenética utilizando técnicas más precisas para obtener resultados más concluyentes.

Palabras clave: Epigenética, jardín común, MSAP, *Silene latifolia*, filogenia, cantidad de DNA nuclear, diferenciación.

Resumo

As diferenzas morfolóxicas das poboacións costeiras de diversas especies vexetais teñen levado á definición de novos taxóns sen atender á base do devandito mecanismo de diferenciación. Neste traballo de fin de grado estudo a posible relación entre as diferenzas fenotípicas de dúas subespecies de *Silene latifolia* (*Silene latifolia*; subsp. *latifolia*, de amplo espectro, e subsp. *mariziana*, propia de cantís costeros e illas) e os patróns epixenéticos de metilación. Para a realización do estudo recolléronse sementes e follas de tres poboacións pertencentes a ambas subespecies. As follas empregáronse para a obtención de DNA mentres que as sementes platáronse baixo condicións comúns. Os estudos filoxenéticos e de volume de DNA realizados descartaron o papel de xenética coma causante das diferenzas entre as dúas subespecies de *S. latifolia*. Sen embargo, a análise morfométrica das plantas cultivadas indicou que as diferenzas morfolóxicas mantéñense na F1 no xardín común o suxire un papel da herencia xenética o de herencia epixenética a longo prazo, mais descarta que as diferenzas sean debidas a plasticidade fenotípica. A análise epixenética realizouse empregando a técnica de amplificación de polimorfismos sensible á metilación (MSAP). Esta técnica permitiu

detectar diferencias estadísticamente significativas entre os patróns de metilación de plántulas das dúas especies criadas en invernadeiro e entre adultos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y os seus descendentes, mais non se atoparon diferencias estadísticamente significativas no patrón global de metilación entre adultos reprodutores dos dous morfos. Se ben o método foi exitoso detectando diferencias en patróns de metilación, no futuro será necesario utilizar un maior tamaño muestral e mellorar a aproximación epixenética empregando técnicas máis precisas para obter resultados máis concluíntes.

Palabras chave: Epixenética, xardín común, MSAP, *Silene latifolia*, filogenia, cantidad de DNA nuclear, diferenciación.

Summary

The morphological differentiation of coastal populations of various plant species has led to the definition of new taxa without addressing the basis of such differentiation. In this study we analyze the possible relationship between the morphological differences of two subspecies of *Silene latifolia* (*S. latifolia* subsp. *latifolia*, with a broad-ecological spectrum, and *S. latifolia* subsp. *mariziana*, a cliff-dwelling plant) and the epigenetic patterns of methylation. Seeds and leaves of three populations belonging to both subspecies were collected. Leaves were used to obtain DNA while seeds were planted under common conditions in a greenhouse. Phylogenetic and nuclear DNA content showed no role of genetics to explain differences between the two subspecies of *Silene latifolia*. However, the morphometric analysis of the cultivated plants indicated that the morphological differences are maintained in the common garden, suggesting a role for genetic inheritance or for long-term epigenetic inheritance but rules out the possibility that differences are due to phenotypic plasticity. An epigenetic analysis using the methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) technique allowed us to detect statistically significant differences between the methylation patterns of the greenhouse-grown seedlings from both populations. Also, differences were detected between adult *S. latifolia* subsp. *mariziana* plants and their seedlings. No statistically significant differentiation was observed in the overall pattern of methylation between reproductive adults of the two morphs. Although the method was successful in detecting differences in methylation patterns between populations, more specific epigenetic methods will have to be applied in order to build on this study and offer more conclusive results.

Keywords: Epigenetics, common garden experiment, MSAP, *Silene latifolia*, phylogenetics, amount of nuclear DNA, differentiation.

Introducción

Los ambientes costeros presentan para las plantas tanto retos como oportunidades debido a las condiciones climáticas bajo las que se encuentran. Por un lado, las temperaturas suaves, libres de heladas o sequías amplían la potencial distribución de las especies intolerantes a los climas extremos. Sin embargo, el estrés físico al que están sometidas debido a la exposición al viento y al agua salada, la dificultad de acceso al agua dulce, el efecto de las inundaciones o la abrasión (Crawford, 2008), son factores limitantes y determinan que estas plantas presenten una morfología adaptada al ambiente costero (Horjales *et al.*, 2009). El aumento de la succulencia de las hojas permite aumentar la capacidad de conservación de agua y previene contra la fuerte radiación; la succulencia también constituye una respuesta adaptativa que contribuye a aumentar la capacidad de retención de sales en las vacuolas y facilita el ajuste osmótico (Lüttge *et al.*, 1993). El aumento de los tricomas, entre ellos de tipo glandular, previene el sobrecalentamiento de la hoja, ayudan a controlar la transpiración y pueden proteger de la abrasión del viento; los tricomas glandulares pueden estar implicados en la excreción de sales (García *et al.*, 2008). En las costas rocosas del noroeste de la Península Ibérica podemos encontrar poblaciones de distintas especies vegetales que muestran algunas o todas las características anatómicas antes citadas, exhibiendo adaptaciones ecológicas y/o fisiológicas al ambiente marino y mostrando un alto grado de plasticidad fenotípica. Es el caso de, entre otras, *Dactylis glomerata* L., *Scilla verna* Huds o *Silene latifolia* Poir. (Linder *et al.*, 1997; Horjales *et al.*, 2009; Almedida da Silva *et al.*, 2013). El estatus taxonómico de estas poblaciones costeras de morfología diferenciada ha sido ampliamente debatido en las últimas décadas (Sanmartín *et al.*, 1998), y a menudo han sido identificadas como endemismos, sin que se hayan realizado estudios moleculares que permitan analizar su grado de diferenciación genética, su aislamiento reproductivo o la heredabilidad de los caracteres que presentan (Almeida da Silva *et al.*, 2013). Mucho menos aún ha sido explorado en estos casos el posible papel de la variabilidad epigenética en la adaptación de las plantas a su entorno (Paun *et al.*, 2010)

La epigenética hace referencia a los mecanismos moleculares que afectan a la expresión de los genes sin alterar la secuencia de bases nitrogenadas o de nucleótidos del DNA, siendo el motor de la plasticidad fenotípica, pero teniendo el potencial de producir plasticidad fenotípica heredable (Kilvitis *et al.* 2014). En plantas, los epialelos pueden producir fenotipos heredables que pueden quedar disponibles a la acción de la selección natural (Fulneček *et al.*, 2014; Cubas *et al.*, 1999). Las marcas epigenéticas, como la metilación del DNA, la modificación de las histonas y la generación de micro RNA no codificantes, son maneras eficientes de modular la actividad genética en respuesta a estímulos internos y externos, produciendo normas de reacción durante la ontogenia de los individuos o cambios heredables durante varias generaciones. Entre los diferentes mecanismos epigenéticos que pueden producir la alteración de la expresión génica, la metilación de las citosinas del DNA es el más comúnmente estudiado (Herrera *et al.*, 2010; Kilvitis *et al.* 2014;). Consiste en la adición por unión covalente de un grupo metilo (-CH₃) al carbono 5 del nucleótido citosina (Covelo, 2015), pudiendo inducir alteraciones fenotípicas rápidas y drásticas como la modificación de la simetría floral, la transformación de los órganos florales y la inhibición de la maduración de los frutos (Herrera *et al.*, 2010). También parece inducir otros cambios fenotípicos menos drásticos incluyendo caracteres continuos como el tiempo de

floración, el tamaño de la planta, fecundidad y resistencia a patógenos o toxinas (Herrera *et al.*, 2010). La metilación del DNA está también asociada al silenciamiento de los transposones (Kilvitis *et al.*, 2014; Covelo, 2015; Rey *et al.*, 2016). A pesar de que la metilación del DNA es el mecanismo epigenético mejor descrito y está envuelto en muchos procesos documentados, existe una carencia de información sobre la estructura de la variación epigenética en poblaciones de plantas silvestres (Herrera *et al.*, 2010). Sin embargo, se han documentado diversos ejemplos del carácter adaptativo de la variabilidad epigenética. Así, se ha demostrado que el aumento de la densidad de los tricomas en *Mimulus guttatus* bajo condiciones de estrés ambiental, como el provocado por la herbivoría, está ligado a la modificación en el estado de la cromatina (Scoville *et al.*, 2011). Este aumento en la densidad de los tricomas puede ser expresado por la progenie que no ha experimentado daños por lo que en el caso de *Mimulus guttatus* el aumento de los tricomas no solo está relacionado con la modificación inducida por el ambiente del estado físico de la cromatina, sino que ese estado puede ser transmitido a la descendencia que no ha experimentado las mismas condiciones ambientales que la generación parental (i.e. herencia epigenética). Asimismo, se ha demostrado que la divergencia epigenética se relaciona con las diferencias ecológicas observadas en varias especies aloploiploides del género de orquídeas *Dactylorhiza*, especialmente en lo que se refiere a la resistencia a la sequía (Paun *et al.*, 2010).

Para este trabajo se decidió utilizar la especie *Silene latifolia* Poir. (Figura 1) por las siguientes razones: a) su amplia distribución y ausencia de status de amenaza, b) facilidad de recolección de semillas y amplia variabilidad en toda la Península Ibérica, principalmente en la región norte y noroeste donde presenta varias subespecies (Castroviejo *et al.*, 1990) de entre las que destacamos *Silene latifolia* subsp. *latifolia* Poir. y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (Gand.) Greuter & Burdet (Caryophyllaceae). *Silene latifolia mariziana* es característica de ambientes costeros y se diferencia de *S. latifolia* por presentar una menor talla, hojas más gruesas y coriáceas, y mayor densidad de pelos glandulíferos (Castroviejo *et al.*, 1990). Es una de las plantas vasculares con dimorfismo sexual más estudiadas, así como un modelo de estudio para la evolución de los cromosomas sexuales en plantas puesto que es dioica y diploide (Toh *et al.*, 2015). La sistemática de este grupo hoy en día sigue siendo cuestionada debido a su gran variabilidad, encontrándose distintas morfologías intermedias, sin correlación ecológica o geográfica que justifique claramente su separación taxonómica (Castroviejo *et al.*, 1990). Por ejemplo, *Silene latifolia* subsp. *mariziana* está citada tanto para las Islas Sisargas en A Coruña como para las Islas Columbretes de Castellón (Castroviejo *et al.*, 1990). En vista de ello, se decidió plantear un Trabajo de Fin de Grado (TFG) para explorar si las diferencias fenotípicas que se observan entre *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* están ligadas a mecanismos genéticos, cromosómicos o epigenéticos.



Figura 1: A la izquierda un individuo de *Silene latifolia* subsp. *mariziana*. A la derecha un individuo de *Silene latifolia* subsp. *latifolia*. A simple vista pueden observarse diferencias morfológicas en el tamaño y la forma de las hojas.

Objetivos

Este estudio pretende especialmente determinar la posible relación de las diferencias morfológicas entre dos subespecies de *Silene latifolia*, *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* sometidas a distintas condiciones ambientales debido a su diferente distribución y los mecanismos epigenéticos de diferenciación basados en los patrones de metilación.

Los objetivos específicos son:

- a) Realizar un análisis filogenético basado en secuencias cloroplásticas de uso común para comprobar si hay diferencias genéticas entre las dos subespecies que expliquen las diferencias morfológicas. No detectar diferencias genéticas nos permitirá continuar explorando la vía epigenética para explicar el fenómeno estudiado.
- b) Realizar un análisis de cantidad de ADN nuclear (poliploidía) para comprobar si *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* difieren en este aspecto como ocurre en otras especies que presentan variabilidad morfológica (Lindner *et al.*, 1997).
- c) Realizar un análisis multilocus de las marcas epigenéticas producidas por la metilación de las citosinas del DNA con el que esperamos detectar una diferencia en el nivel de metilación entre ambas poblaciones que pueda relacionarse con la variabilidad fenotípica.
- d) Germinar semillas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* en un jardín común y observar si las diferencias fenotípicas existentes en las poblaciones naturales se mantienen bajo las mismas condiciones ambientales en la primera generación, o si la morfología varía. Si difieren las plántulas en jardín común ello apuntaría un papel claro de la epigenética como plasticidad fenotípica. Si no difieren podría deberse a diferencias genéticas o a herencia epigenética.

Material y Métodos

Material vegetal y germinación de las semillas

Se analizaron dos poblaciones de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* (Campus de Elviña, A Coruña y Mera, Oleiros, A Coruña) y una población de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (Cabo Vilán, Camariñas, A Coruña). Las principales características de las poblaciones estudiadas se incluyen en la Tabla 1. Diez muestras de tejido foliar fueron recolectadas por población (cada muestra representando un individuo) durante los meses de septiembre de 2016 y marzo de 2017 (el muestreo se realizó en dos ocasiones por la necesidad de conseguir material genético de alta calidad para el estudio epigenético). En todos los casos se seleccionaron hojas sanas que se almacenaron en gel de sílice para su conservación, secado y posterior uso (Pimentel *et al.*, 2007). Asimismo, en ambas localidades se recolectaron cápsulas maduras con semillas que se conservaron en sobres y se almacenaron a 4°C con gel de sílice y en ausencia de luz. La selección de las áreas de muestreo se basó en la información aportada por Castroviejo *et al.* (1990). El material genético de los descendientes de ambas poblaciones se obtuvo a partir del tejido foliar de las plantas producidas a partir de semillas germinadas en el invernadero.

Germinación

Para las pruebas de germinación, el día 28 de noviembre de 2016 se dispusieron lotes de aproximadamente 15 semillas de ambas poblaciones en placas Petri independientes sobre papel de filtro humedecido en agua destilada. Para determinar las mejores condiciones de germinación se hicieron dos grupos, de los cuales uno se incubó en cámara (8 h luz/16 h. oscuridad; 24°C día/20°C noche) y otro se dejó a temperatura ambiente. En cada uno de los grupos, dos placas de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y dos placas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* se cubrieron con papel de filtro para proporcionar oscuridad a las semillas. El mismo número de placas se dejó sin cubrir. A continuación, se realizó un seguimiento de las germinaciones producidas que comenzó en el segundo día después de la preparación de las placas. Las semillas germinadas (cotiledones claramente desarrollados) fueron transferidas a macetas con sustrato vegetal estéril que se llevaron al invernadero de la Facultad de Ciencias (Universidade da Coruña), mientras que aquellas atacadas por hongos fueron retiradas de la placa.

Tabla 1- Localización y características de las poblaciones de *Silene latifolia* recolectadas. Id., identificador; Coord., Coordenadas; F. rec., fecha de recolección

Id.	Taxón	Lugar recolección	Coord.	Hábitats	F. rec.
1	<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>mariziana</i>	Cabo Vilán, Camariñas, A Coruña	43.159929, -9.211153	Costero	09/2016 y 03/2017
2	<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>latifolia</i>	Mera, Oleiros, A Coruña	43.382486, -8.347915	Ruderal	09/2016
3	<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>latifolia</i>	Campus de Elviña, A Coruña	43.327682, -8.413598	Ruderal	09/2016 y 03/2017

Análisis morfométrico

El análisis morfométrico se llevó a cabo empleando un total de 30 individuos de la misma cohorte obtenidos en el invernadero a partir de las semillas recolectadas en las poblaciones de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana*. Del total de individuos, 15 individuos pertenecían a cada subespecie. Para la realización del estudio morfométrico se seleccionaron los siguientes caracteres foliares: longitud de la hoja desde el punto de inserción al tallo, anchura máxima, anchura en el punto medio de la hoja, grosor y densidad de la pilosidad. La selección se basó en los caracteres tradicionalmente empleados en la caracterización de las subespecies (Castroviejo *et al.*, 1990). De cada población se tomaron 15 muestras foliares. Para la estandarización de la toma de medidas, ésta se realizó sobre el primer par de hojas opuestas que están justo por debajo del brote para medir las características eligiendo aleatoriamente una de las dos (15 datos morfológicos por población) para los análisis. Previamente a la toma de la medida del grosor en sección transversal de las hojas, éstas se introdujeron en agua durante 5 minutos para asegurar su turgencia. La densidad de la pilosidad se estimó a la lupa con la ayuda de una lupa binocular y papel milimetrado en un área de 1mm². El análisis estadístico de los datos morfológicos se llevó a cabo en el entorno de R v.3.0.4. Para determinar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas en la morfología de ambas poblaciones se realizó una prueba multivariante de análisis de la varianza (prueba MANOVA), para evitar problemas de colinealidad, y los resultados se representaron en la Figura 4.

Extracción y secuenciación del ADN

Antes de la extracción, el material seco se pulverizó en un molino de bolas Mini Beadbeater (Biospec Products, Dover, florida, USA). Para la extracción del ADN del tejido foliar se utilizó el kit Plant/Fungi ADN Isolation (Norgen Biotek Corporation) y el kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel), en ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción consiste en la rotura de las membranas celulares para liberar el ADN, la filtración y resuspensión del mismo. Se comprobó la calidad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en la que se añadió un marcador de peso molecular (NZYDNA ladder VI, NZYTech, Lisboa Portugal). Asimismo, se utilizó el Nanodrop 1000 (ThermoScientific, Waltham, Estados Unidos) para cuantificar la concentración y la pureza del ADN. Se extrajo el ADN de un total de 6 muestras, 4 pertenecientes a *S. latifolia* subsp. *latifolia* y 2 de *S. latifolia* subsp. *mariziana*.

Se realizó una primera prueba de amplificación empleando cinco regiones de ADN cloroplástico no codificantes de uso común en estudios filogenéticos (Taberlet *et al.*, 1991; Downie *et al.*, 1996; Downie *et al.*, 1999). De estas cinco regiones, cuatro fueron finalmente seleccionadas para el estudio filogenético mientras que una de ellas, *trnK*, fue finalmente descartada por sus pobres resultados. En todos los casos, la amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) y con la siguiente mezcla de reacción (25µL): 16.25 µL de H₂O, 2.50 µL de Buffer PCR, 3 µL de MgCl₂ (25mM), 0.50 µL de dNTPs (10mM), 1 µL de BSA (1%; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos), 0.25

μL de cada uno de los cebadores (10μM), 0.25 Taq polimerasa y 1μL de muestra de ADN. Los cebadores empleados para cada una de las regiones seleccionados se indican en la Tabla 2. El programa de amplificación por PCR (ColdSlow; Shaw *et al.*, 2005) consistió en una desnaturalización a 80° durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 1 minuto a 95°, una fase de anillamiento de 1 minuto a 50° a la que se le van sumando 0.3°C por segundo por ciclo, una fase de extensión de 65° durante 4 minutos y finalmente una extensión a 65° durante 5 minutos. En cada amplificación, el blanco se realizó introduciendo el mismo volumen de todos los compuestos excepto de ADN extraído.

Todos los resultados de la amplificación se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% al que se le añade un marcador de peso molecular (NZYDNA ladder VI, NZYTech, Lisboa Portugal) para comprobar que todas las secuencias tienen el tamaño esperado, la ausencia de señal en la reacción usada como blanco (sin ADN) y ausencia de amplificaciones inespecíficas.

Tabla 2- Cebadores empleados para la amplificación de las distintas regiones.

Región	Primers	(Secuencia 5' -> 3')
<i>trnT-L</i>	Tab-a	CATTACAAATGCGATGCTCT
	Tab-b	TCTACCGATTTCGCCATATC
<i>trn L-F</i>	Tab-e	GGTCAAGTCCCTCTATCCC
	Tab-f	ATTTGAACTGGTGACACGAG
<i>rps16</i>	Rps16-F	AAACGATGTGGNAGNAARCA
	Rps16-R	CCTGTAGGYTGNGCNCCYTT
<i>rpoC</i>	5'rpoC1	GGTCTTCCTAGYTAYATHGC
	3'rpoC1	AATAAGCAYAANACCATCCA

Para poder proceder posteriormente a la secuenciación, los productos de PCR se purificaron mediante la mezcla de enzimas ExoSap (Affymetrix, Santa Clara, California, USA Estados Unidos) eliminando así cualquier resto de nucleótidos no consumidos o cebadores remanentes. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador 3130x1 de Applied Biosystems (Foster City, California, Estados Unidos) a través de la empresa MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda). Las secuencias forward y reverse se ensamblaron y se editaron con el programa CodonCode Aligner v.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA).

Creación de las bases de datos y alineamiento

Las secuencias en las que se basó la parte filogenética de este trabajo se obtuvieron de dos fuentes. Mediante extracción del tejido foliar de las poblaciones de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* de y *Silene latifolia* subsp. *mariziana*, en total 6 secuencias de *Silene latifolia*. Para poder comparar nuestras poblaciones se obtuvieron secuencias de *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y de *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) correspondientes con las regiones cloroplásticas *rps16*, *rpoC*, *trnT-L*, y *trnL-F* de *Silene latifolia*. La matriz del marcador *rps16* constaba de 21 secuencias, la del marcador *rpoC* constaba de 18 secuencias, la de *trnT-L* consta de 67 secuencias y la de *trnL-F* consta de 148 secuencias. Para enraizar la filogenia se obtuvieron secuencias de *Silene dioica* (L.) Clariv. para cada uno de los marcadores.

El alineamiento se realizó con el algoritmo *Muscle* y fue visualizado con el programa SeaView v.3.2 (Galtier *et al.*, 1996). Una vez alineadas las secuencias el alineamiento fue corregido manualmente usando el programa MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013). A continuación se creó un archivo .fasta para cada una de las regiones cloroplásticas utilizadas. Las bases de datos finales estuvieron formadas por 26 secuencias para la región *rps16*, 24 secuencias para *rpoC*, 73 secuencias para *trnT-L* y 90 secuencias para *trnL-F*. En cada una de las bases de datos finales se incluyó una secuencia perteneciente a *Silene dioica* para enraizar la filogenia y 6 procedentes del material extraído en el laboratorio (2 de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia*).

Teniendo en cuenta el bajo número de caracteres parsimoniosamente informativos observado en las matrices plastídicas (ver sección Resultados), se realizó una concatenación de las distintas regiones. Se emplearon cuatro matrices del mismo tamaño consituidas por 24 secuencias, de las cuales 6 pertenecían al tejido extraído del campo; 17 se obtuvieron en las bases de datos y se añadió una secuencia de *Silene dioica* como grupo externo. Para la concatenación se empleó el programa Mesquite v. 2.73 (Maddison *et al.*, 2010).

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el test de máxima parsimonia, que se basa en la búsqueda del árbol más probable que puede ser explicado mediante el menor número de sustituciones en los pares de bases, es decir, el menor número de cambios evolutivos (Salemi *et al.*, 2009). El análisis de parsimonia no requiere el establecimiento de asunciones a priori acerca del modo de evolución de la secuencia. Se utilizó la secuencia de *Silene dioica* para el enraizamiento en cada uno de los marcadores. Los gaps del alineamiento fueron ignorados en el análisis, para el cual se utilizó el software PAUP v.4 (Swofford, 2000). En nuestro análisis se les dio el mismo peso a todos los caracteres del alineamiento. Se realizó una búsqueda heurística con 1000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*) utilizando la permutación de ramas tipo TBR (*Tree bisection Bisection Reconnection*). Además, se empleó el algoritmo *branch and bound* para aumentar la eficacia de las búsquedas. Finalmente, la fiabilidad de los nodos de la topología se estableció mediante

la técnica de *bootstrapp* con 10000 réplicas. De ese modo la rama de cada árbol tendrá un apoyo equivalente al porcentaje de árboles en los que figura el clado generado por ella. Los árboles resultantes de todos los análisis filogenéticos fueron visualizados y editados empleando el programa FigTree v.1.4.0. (Rambaut, 2012).

Poliploidía: Análisis de la cantidad de ADN nuclear

Este análisis se realizó externamente en el Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Ecología Funcional, Universidad de Coimbra. La cantidad de ADN nuclear se estimó mediante citometría de flujo (FCM) siguiendo el procedimiento de Galbraith *et al.* (1983) y Loureiro *et al.* (2007). Los valores obtenidos se expresaron en picogramos (pg) y en mega pares de bases (Mbp) usando la fórmula de Doležel *et al.* (2003) (1 pg = 978 Mbp). Se evaluaron un total de 6 individuos (3 especímenes por taxón).

Epigenética

Para realizar este trabajo se eligió una metodología generalista que permitiera estudiar el patrón de metilación global sin tener conocimiento de la secuencia de una determinada región. Para esto utilizaremos la técnica de amplificación de polimorfismos sensible a metilación (*MSAP*), una modificación del *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP; Herrera *et al.*, 2010; y Fulneček *et al.*, 2014), muy utilizada sobre todo en organismos no modelo (Fulneček *et al.*, 2014). La técnica *MSAP* se basa en el uso de tres enzimas de restricción, dos de ellas isoesquizómeras que reconocen la misma diana de restricción (CCGG) pero presentan distinta sensibilidad a la metilación y la digestión dependerá del estado de metilación de las citosinas (Figura 2). Esto permite obtener patrones de digestión comparables en base a los fragmentos que se generan al tratar el ADN con cada una de las enzimas isoesquizómeras por separado. La enzima de corte poco frecuente es EcoRI. Las enzimas isoesquizómeras de corte frecuente son HpaII y MspI. HpaII no corta si una o dos citosinas están metiladas en ambas cadenas, pero corta si la metilación se produce en una sola de las cadenas o hay ausencia de metilación. En cambio, MspI únicamente corta cuando la metilación se produce en las citosinas internas de ambas cadenas o en ausencia de metilación (Herrera, 2010). Esta metodología se ha utilizado satisfactoriamente en plantas (Fresnedo-Ramírez *et al.*, 2017).

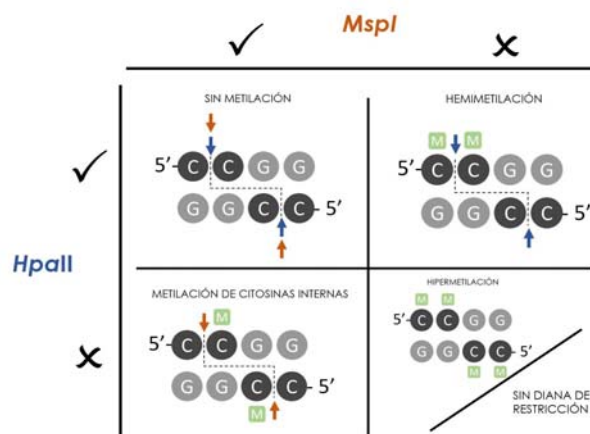


Figura 2: Actividad de las enzimas isoesquizómeras HpaII y MspI en función del estado de metilación de las citosinas de la secuencia diana. Las flechas azules indican el punto de corte de la enzima HpaII. Las flechas naranjas indican el punto de corte para la enzima MspI. Imagen de Covelo, (2015).

Para la organización de este estudio se utilizaron 40 muestras obtenidas mediante la extracción de ADN a partir de tejido foliar de 10 individuos de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* pertenecientes a la población de Elviña, 10 individuos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* pertenecientes a la población de Cabo Vilán, 10 individuos de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* procedentes de las plantas crecidas en el invernadero a partir de las semillas recogidas en Elviña y 10 individuos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* procedentes de las plantas crecidas en el invernadero de las semillas recogidas en Cabo Vilán. Para realizar esta técnica hay que tratar las 40 muestras con dos combinaciones de enzimas, HpaII-EcoRI y MspI-EcoRI por separado. Por lo tanto, durante el proceso se trabajarán con 80 muestras. La Figura 3 incluye un resumen de los distintos pasos de la técnica MSAP, que se describen a continuación:

- El primer paso es realizar una digestión y paralelamente un ligamiento de los adaptadores utilizando 4.25 µL de agua, 1 µL de buffer, 0.5 µL de BSA, 1 µL de buffer ligasa (Roche, Basilea, Suiza), 1 µL del adaptador de EcoRI, 0.1 µL de adaptador HpaII-MspI, 0.25 µL EcoRI, 0.1 de enzima HpaII o 0.005 µL de MspI (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos), 0.005 µL T4 ligasa y 1 µL de ADN a una concentración de 50 ng/µL. Se incubaba a 37°C durante dos horas. Al resultado de la digestión le añadiremos 90 µL de agua estéril y se conservarán a -20°C. El resultado de la digestión va a producir fragmentos con extremos EcoRI-EcoRI, EcoRI-HpaII, HpaII-HpaII en un caso y EcoRI-EcoRI, EcoRI-MspI y MspI-MspI en el otro.
- El segundo paso es hacer una PCR preselección utilizando un volumen final de 21.2 µL de una mezcla constituida por: 10.5 µL de agua, 2 µL de buffer (Bioline, Londres, Reino Unido), 1.5 µL de dNTPs, 1 µL de MgCl₂ (50mM), 0.2 µL Taq polimerasa (Bioline, 5U/ µL), 4 µL de digestión diluida, 1 µL de primer Eco+A (20 µM), 1 µL de primer HpaII-MspI+T (20 µM). El programa de amplificación de la PCR preselección consiste en una predesnaturalización a 72° durante 2 minutos, seguido de 20 ciclos compuestos por una desnaturalización de 20 segundos a 94°, una fase de anillamiento de 30 segundos a 56°, una fase de extensión de 72° durante 2 minutos y finalmente una extensión a 60° durante 30 minutos. La secuencia

de los cebadores utilizados incorpora un nucleótido selectivo que es adenina en el caso de EcoRI y timina en el de HpaII y MspI.

- c) 10 μ L del sustrato obtenido mediante la PCR preselección se utiliza para una segunda PCR selectiva diluyéndolo en 90 μ L de agua. En la segunda PCR empleamos un volumen final de 21.2 μ L de una mezcla constituida por: 10.5 μ L de agua, 2 μ L de buffer (10x), 1.5 μ L de dNTPs, 1 μ L de $MgCl_2$ (50mM), 0.2 μ L Taq polimerasa (Bioline, 5U/ μ L), 4 μ L de digestión diluida, 1 μ L primer HpaII+3 nucleótidos marcados (8.3 μ M), 1 μ L de primer MspII+3 nucleótidos marcados (8.3 μ M). El programa de amplificación de la PCR selectiva consiste en una predesnaturalización a 94° durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos compuestos por una desnaturalización de 20 segundos a 94°, una fase de anillamiento de 30 segundos a 66°, una fase de extensión de 72° durante 2 minutos. A continuación, se llevan a cabo una serie de 20 ciclos compuestos por una desnaturalización de 20 segundos a 94°, una fase de anillamiento de 30 segundos a 56°, una fase de extensión de 72° durante 2 minutos y finalmente una extensión a 60° durante 30 minutos.
- d) Los fragmentos de ADN resultantes de la PCR selectiva se resolvieron en el analizador de fragmentos AB 3130 de Applied Biosystems situado en el C.A.C.T.I. (Centro de Apoyo Científico e Tecnológico á Investigación, Universidade de Vigo) para obtener los valores de fluorescencia correspondientes a los fragmentos amplificados. Para calcular el tamaño de los picos se emplea el marcador Rox 500 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) como patrón de carril interno y se añade formamida para impedir la renaturalización de las cadenas. Posteriormente se analizaron mediante el software GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) y manualmente se eliminaron las secuencias que mostraban una baja calidad, picos demasiado densos o muy bajos visualizando el electroferograma. Como resultado, de las 80 muestras con las que trabajábamos inicialmente, después de la depuración continuamos los análisis con 76 individuos. Con los resultados se elaboró una matriz de datos binaria codificada mediante ceros (ausencia) y unos (presencia) en base a la presencia/ausencia de fragmentos para una determinada posición que se considerará un locus.

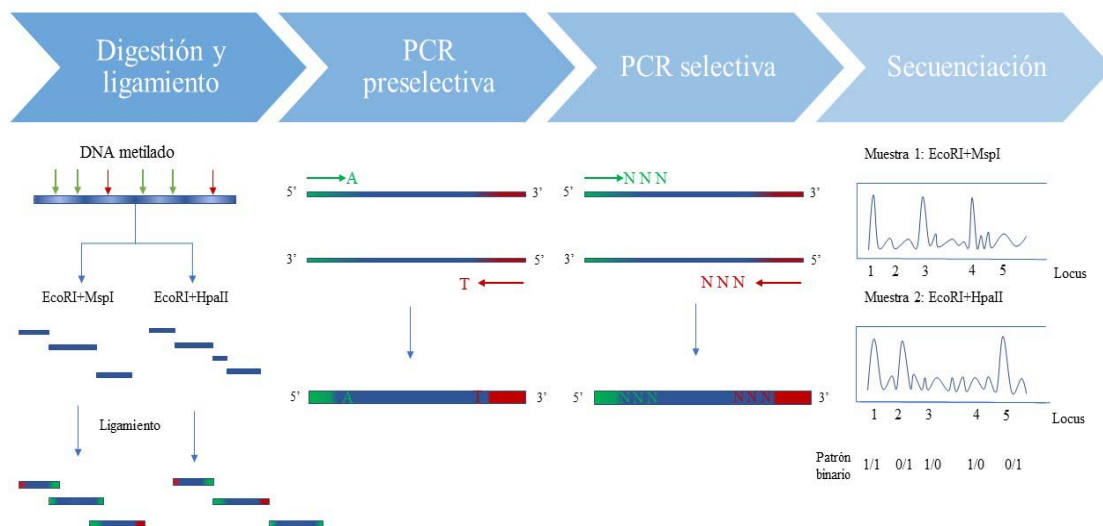


Figura 3: Esquema de la técnica MSAP. Las líneas azules representan el ADN. Las flechas verticales indican las dianas de restricción de la enzima EcoRI (verdes) y MspI o HpaII (rojas). Las flechas horizontales representan los adaptadores para EcoRI (verdes) y MspI o HpaII (rojas). Modificado de Bilichak et al. (2017) y Covelo et al. (2015).

Para realizar el análisis multilocus se utilizó el paquete *msap* (Pérez-Figueroa 2013) para el entorno R v. 3.0.4. En función del resultado de la matriz binaria, el paquete *msap* realiza una nueva matriz clasificando cada locus en cuatro posibles estados (i) estado no metilado cuando haya presencia de los productos *EcoRI-HpaII* y *EcoRI-MspI* en una muestra dando lugar un patrón binario 1/1; (ii) hemimetilado cuando hay presencia de productos *EcoRI-HpaII* y ausencia de *EcoRI-MspI*, (patrón binario 1/0); (iii) metilado en las citosinas internas cuando hay presencia de productos *EcoRI-MspI* y ausencia de *EcoRI-HpaII* (patrón binario 0/1), y (iv) estado no informativo, se considera cuando hay ausencia de los dos productos *EcoRI-HpaII* y *EcoRI-MspI* (patrón binario 0/0) ya que no es posible determinar si la ausencia se debe a existencia de metilación en las posiciones para las cuales ambas enzimas son sensibles o la falta de diana de restricción.

Teniendo en cuenta que el ERT (error asociado a cada par de cebadores) se establece en el 5%, los loci se clasifican como MSL (*Methylation-Susceptible Loci*) o NML (*Non-Methylated Loci*) dependiendo de si la proporción de muestras con patrones discordantes (HPA+/MSP- y HPA-/MSP+), indicativos de metilación, superan el valor de ERTT (MSL) o no (NML). En este último caso, las diferencias podrían deberse al azar y no se puede asegurar que haya diferencias de metilación (Covelo, 2015). En el caso de los MSL, el programa aporta también la proporción de los distintos estados de metilación y los niveles de metilación relativa para cada grupo de estudio. La diferenciación epigenética y genética se estimó mediante un análisis de componentes principales (PCoA) representado en un gráfico bidimensional utilizando el software GenAlEx v6.503 (Peakall, 2012) para Excel. Las diferencias entre las poblaciones problema se comprobaron mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el coeficiente Φ_{ST} y su valor de significación estadística asociado, con 10.000 permutaciones, usando el paquete *msap* (Pérez-Figueroa 2013).

Resultados

Germinación de las semillas y supervivencia de las plántulas

Como resultado de las pruebas de germinación realizadas se determinó que la mejor metodología a seguir para la germinación de las semillas era a temperatura ambiente y en oscuridad (Tabla 3). Del total de 174 semillas de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* que se pusieron a germinar el 28 de noviembre de 2016, se plantaron 100 individuos en tierra, de los cuales a día de hoy sobreviven 20 plantas (20%). En cambio, del total de 176 semillas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* que se pusieron a germinar en la misma fecha solo se plantaron 41 individuos, de los cuales a día de hoy no sobrevive ninguno.

Tabla 3 - Porcentaje de semillas germinadas según los distintos tratamientos. Osc., oscuridad; cam., cámara de cultivo.

	Luz/No Cam	Osc./No Cam.	Luz/Cam.	Osc./Cam.
<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>latifolia</i>	21,42%	61,90%	7,10%	9,50%
<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>mariziana</i>	28,60%	35,23%	19,05%	17,14%

Análisis morfométrico

Mediante la prueba MANOVA detectamos diferencias estadísticas significativas entre las características morfológicas estudiadas de las dos poblaciones de *Silene latifolia* crecidas en el invernadero en jardín común ($F = 15.86$; $p\text{-valor} < 0.05$). Como se observa en las gráficas de medias (Figura 4) todas las variables estudiadas muestran una clara diferenciación. Únicamente en la medida *longitud de la hoja* puede verse como los errores típicos se solapan

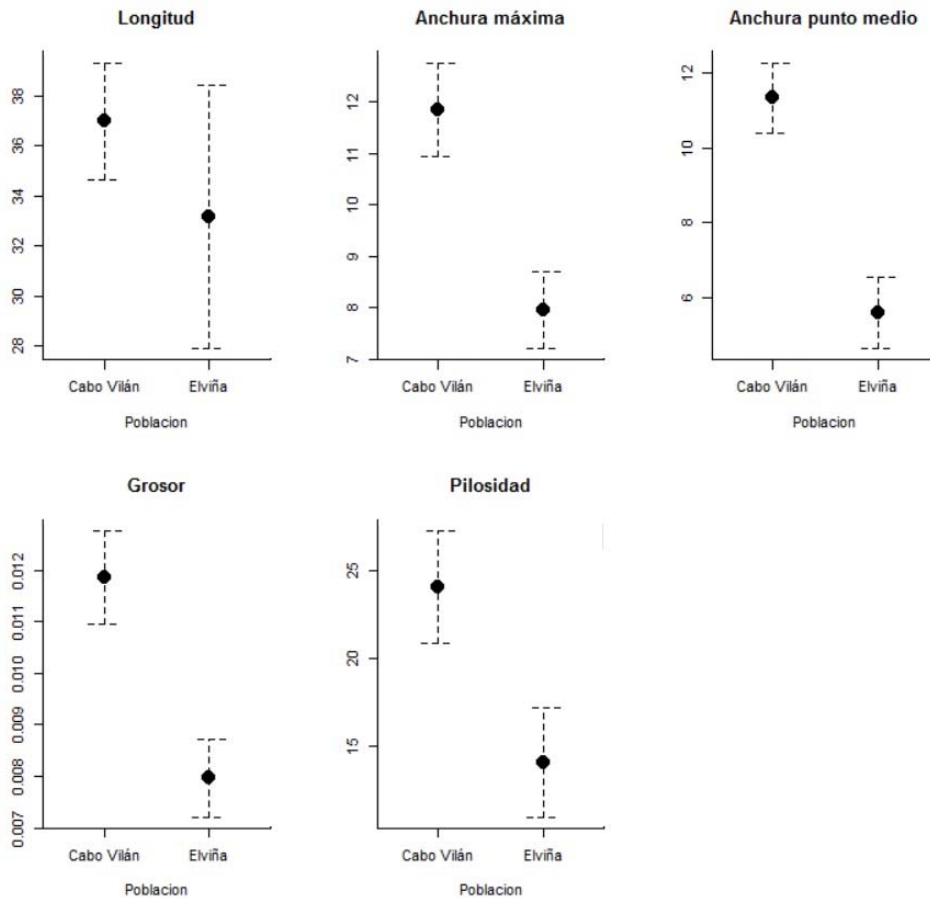


Figura 4: Representación de las medias con sus respectivos intervalos de confianza al 95% para los caracteres morfológicos estudiados: longitud, anchura de la hoja en el punto máximo, anchura en el punto medio y pilosidad para las plantas de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (Cabo Vilán) y las plantas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* crecidas (Elviña) en el invernadero

Análisis filogenético

El análisis basado en la región *trnL-F* consistió en una matriz formada por 90 taxa, de 1037 caracteres de los cuales se excluyeron 1016 y 21 se consideraron parsimoniosamente informativos. El índice de consistencia (CI) de esta región fue 0.815 mientras que el índice de retención (RI) fue de 0.931. El análisis basado en la región *trnT-L* se realizó en una matriz formada por 73 taxa, de 675 caracteres, de los cuales se excluyeron 669 mientras que 6 resultaron parsimoniosamente informativos. El CI y el

RI de esta región fueron 1.000. El análisis basado en la región *rpoC* consistió en una matriz formada por 24 taxa, de 605 caracteres de los cuales se excluyeron 604 y únicamente 1 carácter se consideró parsimoniosamente informativo (CI, RI = 1.00). Finalmente, el análisis basado en la región *rps16* consistió en una matriz formada por 26 taxa, de 890 caracteres de los cuales fueron excluidos 876 mientras que 14 fueron considerados parsimoniosamente informativos (CI, RI = 1.00). La concatenación de todas las regiones consideradas produjo una matriz de 3212 caracteres de los cuales se excluyeron 3204 y 8 resultaron parsimoniosamente informativos. El CI de la matriz concatenada fue de 0.8, y el RI de 0.950. Dada la gran disparidad en lo que se refiere al número de secuencias incluidas en cada matriz individual, y con el objetivo de evitar la proliferación de datos perdidos, no todas las secuencias se incluyeron en la matriz concatenada.

Por lo que se refiere a las topologías obtenidas de las distintas regiones cloroplásticas (no se muestran), éstas resultaron coherentes (no se observaron diferencias estadísticamente significativas; con un apoyo bootstrap superior a 0.8), por lo que se llevó a cabo la concatenación de las matrices. El análisis concatenado mostró una resolución muy superior a los análisis individuales y se muestra en la Figura 5. Los valores de apoyo estadístico dentro del árbol son por lo general bajos, formándose diversas politomías. Los resultados no detectan una clara diferenciación entre los especímenes de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia*, si bien se observa una cierta agrupación de los primeros (bootstrap=0.54). En cambio, la topología sí diferencia las secuencias obtenidas en el Laboratorio de Botánica de aquellas procedentes de las bases de datos (bootstrap= 0.78). Se observa también dentro de la topología una politomía basal entre *Silene latifolia* (ambas subespecies) y el grupo externo (*Silene dioica*). Finalmente, no se aprecia estructura filogenética dentro del conjunto de muestras de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* obtenidas de bases de datos públicas. Únicamente podemos observar un agrupamiento de 4 muestras enumeradas del 6 al 9.

Análisis poliploidía

No se observaron diferencias apreciables en el contenido de ADN nuclear entre las muestras de *Silene latifolia* analizadas por el Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Ecología Funcional en la Universidad de Coimbra. Para ambos taxones los valores medios de ADN nuclear (valor 1C, medido en pg) fueron 2,74 (*Silene latifolia* subsp. *latifolia*) y 2,63 (*Silene latifolia* subsp. *mariziana*).

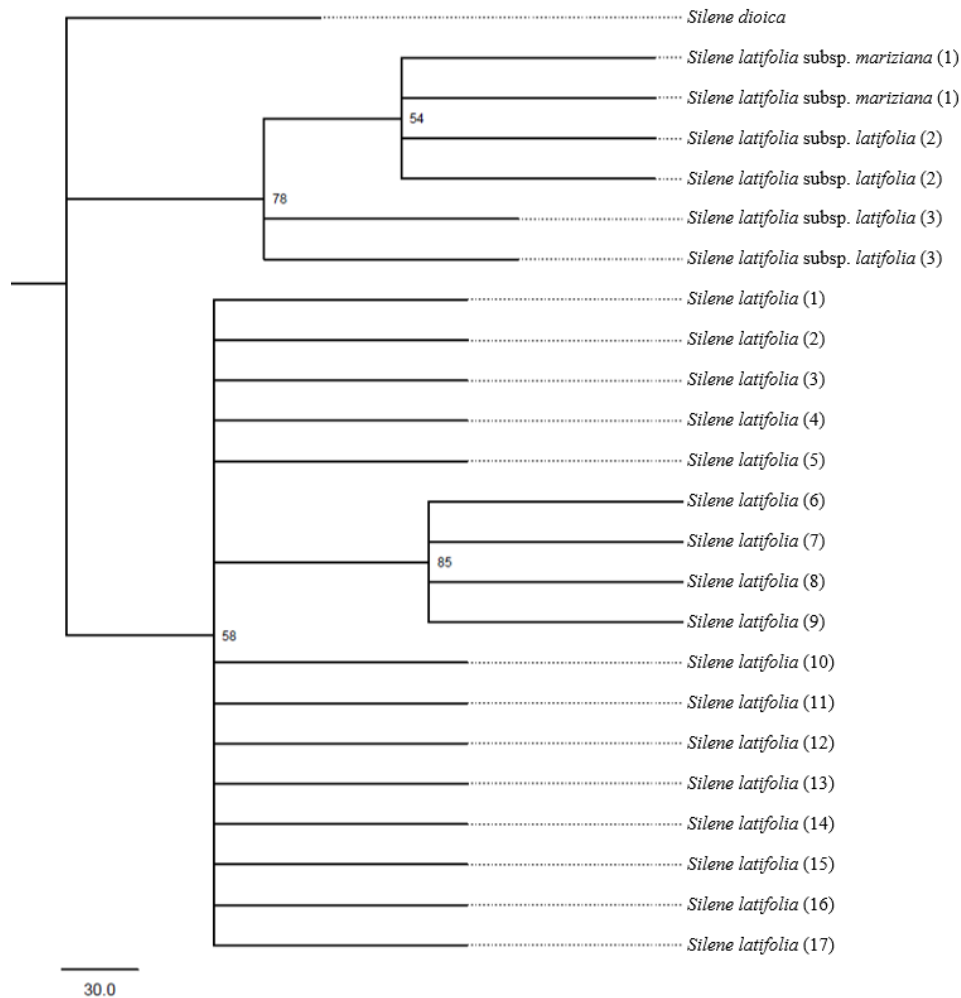


Figura 5: Topología de máxima parsimonia resultante de la concatenación de 3212 caracteres de las secuencias cloroplásticas *trnT-L*, *trnL-F*, *rpoC* y *rps16*. Las especies de *Silene latifolia* enumeradas del 1 al 3 se corresponden con las muestras obtenidas en el laboratorio recogidas en la Tabla 1. Las especies de *Silene latifolia* enumeradas del 1 al 17 pertenecen a las secuencias obtenidas en las bases de datos.

Análisis epigenético

Se obtuvieron un total de 156 loci a partir de los cuales se hicieron dos tipos de análisis multilocus para estimar la diferenciación epigenética entre los grupos: un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y una prueba AMOVA usando 10.000 permutaciones. Para estudiar las diferencias entre los distintos grupos de interés se realizaron las siguientes pruebas: (i) Un análisis global, teniendo en cuenta cuatro poblaciones; la primera (Pop 1 en la Figura 6) formada por individuos de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* (Campus Elviña. A Coruña), la segunda (Pop 2) formada por individuos procedentes de las plantas germinadas en el invernadero a partir de las semillas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* de la población de Elviña, la tercera (Pop 3) formada por

individuos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (Cabo Vilán, Camariñas, A Coruña) y la cuarta (Pop 4) formada por individuos germinados en el invernadero a partir de las semillas de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* de la población de Cabo Vilán; y (ii) Un segundo análisis haciendo comparaciones de las poblaciones dos a dos.

El análisis global produjo un total de 156 loci para los 76 individuos de las 4 poblaciones mediante la técnica MSAP. Cada locus se clasificó como susceptible de metilación (MSL) o no metilado (NML) dependiendo de si la proporción observada de puntuaciones discordantes obtenidas con las enzimas HPA+/MSP– y HPA–/MSP+ superaba un valor umbral. 48 loci superaron el valor ERT y se clasificaron como MSL, de los cuales se consideraron polimórficos 33 (69% del total). Un marcador se consideró polimórfico cuando al menos dos individuos de la misma muestra revelaban una puntuación diferente. Un total de 108 loci fueron considerados no metilados (NML) de los cuales 54 (50%) fueron polimórficos. La prueba AMOVA reveló diferencias estadísticamente significativas en los patrones globales de metilación de los MSL de las 4 poblaciones analizadas ($\Phi_{ST}=0.05847$, p-valor < 0.05) sin embargo no encontró diferencias estadísticamente significativas ($\Phi_{ST}=0.1196$, p-valor > 0.05) para el análisis de los NML entre las 4 poblaciones estudiadas. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se representó en un gráfico bidimensional que no parece diferenciar los grupos de forma tan clara. Las dos primeras coordenadas (C1 y C2) acumulan respectivamente un 16% y un 12.5% de la varianza total (Figura 6).

Tabla 4: Resumen de los resultados obtenidos mediante el análisis multilocus (AMOVA y PCoA). Se especifica el número de individuos, el número de loci MSL y NML, el número de loci polimórficos para cada uno el p-valor obtenido mediante la prueba AMOVA para los MSL, los porcentajes de variabilidad explicada para los dos primeros ejes del PCoA.

	nº	nº loci	nº loci	MSL	NML	p-valor para		
Poblaciones	individuos	MSL	NML	polimórficos	polimórficos	MSL	C1	C2
Pop1-Pop3	18	44	112	29 (66%)	20 (18%)	0,1041	22,90%	15,50%
Pop2-Pop4	18	60	96	34 (57%)	36 (38%)	0,0233	20,30%	14,20%
Pop1-Pop2	19	48	108	31 (65%)	19 (18%)	0,2405	17,70%	14,10%
Pop3-Pop4	17	59	97	32 (54%)	34 (35%)	0,0285	21%	17,20%

Las comparaciones dos a dos (Tabla 4) revelaron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones 2 y 4 que corresponden a las dos procedentes de las semillas germinadas en el invernadero de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (p-valor < 0.05). La comparación entre las poblaciones 3 y 4 que corresponden con individuos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* (Cabo Vilán, Caamariñas, A Coruña) y los individuos germinados en el invernadero a partir de las semillas de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* de la población de Cabo Vilán también muestran diferencias estadísticamente significativas en los patrones de metilación (p-valor < 0.05). Las comparaciones entre las poblaciones 1 formada por los individuos de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* y 3 formada por individuos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y las poblaciones 1 y 2, formada por individuos procedentes de las plantas

germinadas en el invernadero a partir de las semillas de *Silene latifolia* subsp. *latifolia* de la población de Elviña, no mostraron diferencias estadísticamente significativas (p -valor > 0.05).

Con respecto a las diferencias epigenéticas detectadas entre las poblaciones mediante el PCoA de los MSL, se obtuvieron porcentajes de variabilidad muy bajos para las dos primeras coordenadas (C1 y C2) en todas las comparaciones dos a dos de las poblaciones de estudio. Como se puede observar en la Figura 6, únicamente se intuye una posible diferenciación entre las poblaciones 3 y 4 porque ambas poblaciones se ven más separadas en el espacio con respecto al resto de gráficas.

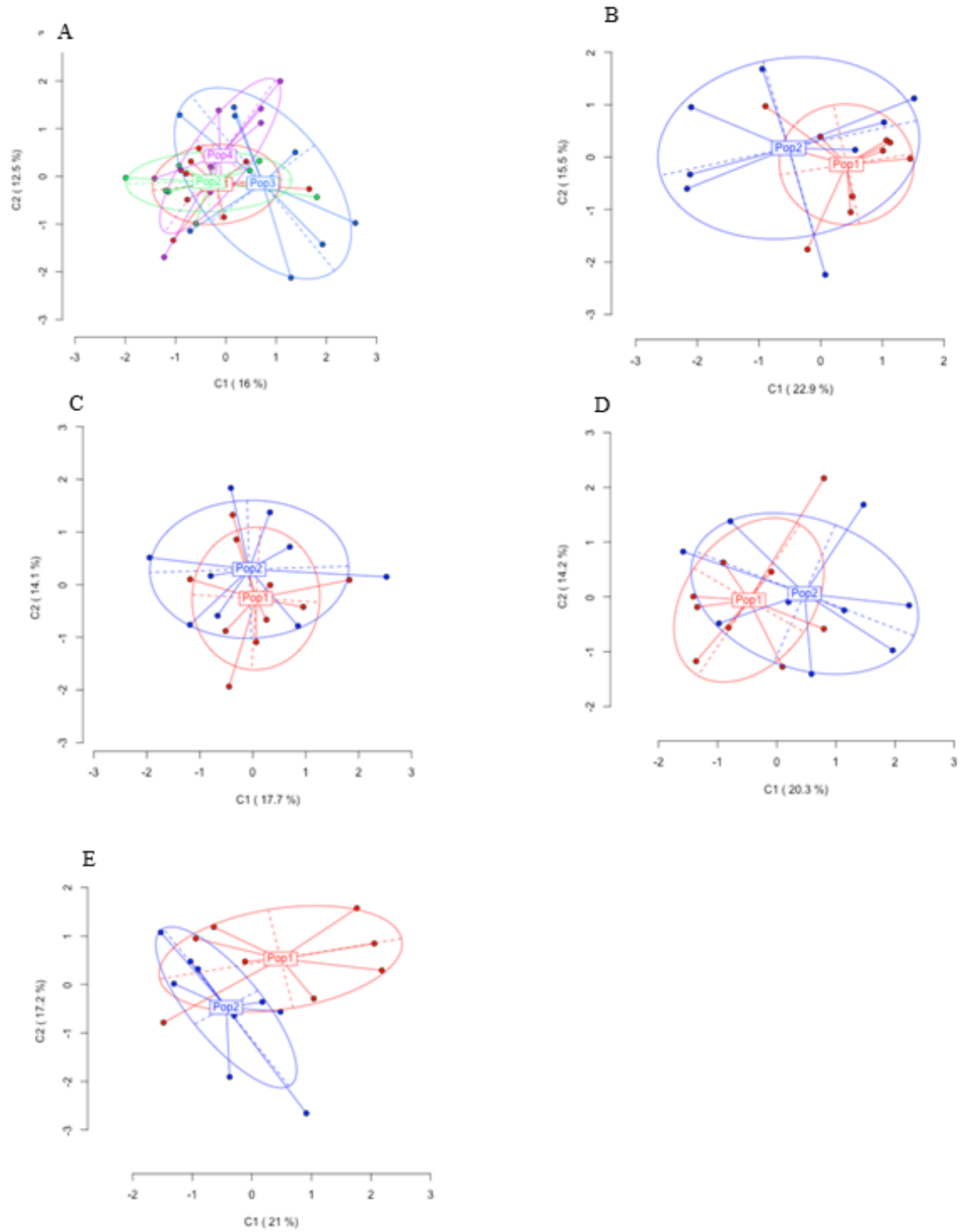


Figura 6: Resultado del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para las diferencias epigenéticas entre las cuatro poblaciones estudiadas. Las dos primeras coordenadas (C1 y C2) se representan con sus respectivos porcentajes de variabilidad explicados. A: Comparación de 4 poblaciones. B-E: Comparación de las poblaciones dos a dos; B: Población 1- Población 3. C: Población 1- Población 2. D: Población 2- Población 4. E: Población 3-Población 4.

Discusión

El objetivo principal con el que se planteó este estudio fue determinar si las diferencias fenotípicas entre los dos morfos de *Silene latifolia* estudiados (costa vs interior) se debían a cambios en la secuencia de los nucleótidos, a cambios en el número de cromosomas o a la variabilidad epigenética de las poblaciones. Por lo que respecta al primer punto podemos decir que el árbol concatenado mostró mayor poder resolutivo y apoyo estadístico que los árboles basados en las secuencias cloroplásticas individuales. La concatenación tuvo mayor apoyo estadístico al utilizar un mayor número de caracteres y estar basado en 4 matrices que fueron intencionadamente elaboradas del mismo tamaño de manera que no se obtuvieran para ninguna región datos perdidos o ausentes que pudieran disminuir el poder resolutivo. El análisis filogenético basado en marcadores cloroplásticos del árbol concatenado no reveló diferencias entre las poblaciones de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia* por lo que nos permite descartar la posibilidad de que las diferencias entre los morfos se deban a diferencias en la secuencia de DNA. Es necesario añadir que en este trabajo estamos basándonos en marcadores cloroplásticos en los que no se produce recombinación, por lo tanto, estas secuencias permiten su uso general, pero al mismo tiempo eso mismo hace que se mantengan bastante estables. No podemos descartar la posibilidad de que en el caso de utilizar marcadores más específicos pudieran manifestarse diferencias genéticas entre las dos poblaciones de estudio.

La poliploidía se considera una de las mayores fuerzas de evolución en plantas que afecta a la diversificación y la especiación (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2013). Dado que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ADN de las plantas crecidas en el invernadero de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia*, podemos descartar que la existencia de estos dos morfos se deba al número de cromosomas como consecuencia de un evento de poliploidización. Esto nos permite continuar explorando la posibilidad de que las diferencias morfológicas entre *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia* se deban a un efecto epigenético motivado por las condiciones ambientales bajo las que se encuentra cada población. Es necesario señalar que con esto no queremos decir que epigenética y poliploidía no estén íntimamente relacionadas en numerosos casos (Paun *et al.*, 2010).

En cuanto a la opción epigenética, aunque se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre plántulas de las dos especies criadas en invernadero y entre adultos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* de la población costera y plántulas derivadas de sus semillas en invernadero, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón global de metilación entre adultos reproductores de los dos morfos.

Por un lado, hay que tener en cuenta que la técnica MSAP infraestima los niveles de metilación del ADN porque únicamente detecta la metilación en las posiciones CCGG y no es capaz de discriminar entre metilación y ausencia de fragmento cuando están metiladas las dos citosinas de ambas cadenas (Herrera *et al.*, 2010), dando lugar a interpretaciones ambiguas que en ocasiones pueden ser inconsistentes con los conocimientos de la metilación en plantas y animales (Fulneček *et al.*, 2014). Se ha observado que gran parte de los fragmentos HpaII asilados (tipo de corte 0/1 MspI-HpaII) contienen al menos una diana interna de CCGG que no ha sido cortada por las enzimas (Fulneček *et al.*, 2014). Debido a la alta tasa de *scoring errors* que presentan los AFLP (Bonin *et al.*, 2004), superior a la de otros marcadores moleculares, y en consecuencia la técnica MSAP (basada en la técnica AFLP), es necesario hacer réplicas de los individuos y así evitar que aquellos que han amplificado mal distorsionen los

resultados, sobre todo en el caso de estudios como el que presentamos donde el número de individuos es muy bajo. En definitiva, la técnica MSAP ha mostrado ser útil debido a su bajo coste y sencillez, pero es necesario ser muy cuidadoso en su interpretación. Puede encontrarse una revisión de los beneficios de esta técnica en Schrey et al. (2013).

En consistencia con los indicios mostrados por los estudios de Brothers *et al.* (2016) con dos poblaciones de *Silene latifolia* de España y Croacia, las diferencias encontradas en la morfología de las plántulas de ambos morfos criadas en ambiente común, demuestra que la primera generación de mantiene las diferencias morfológicas típicas de los adultos. Esto puede deberse a cuestiones genéticas pero no se puede descartar la hipótesis de que las diferencias morfológicas se basen en diferencias en las marcas epigenéticas puesto que éstas pueden tardar varias generaciones en desaparecer (Johannes *et al.*, 2009), lo cual indicaría la existencia no sólo de plasticidad fenotípica en *Silene latifolia* debida a epigenética sino de herencia epigenética.

La pregunta de estudio sigue pues abierta y será necesario continuar esta investigación en el futuro mejorando la aproximación epigenética con técnicas que trabajen locus a locus en lugar de usar técnicas multi-locus, ampliar tamaños de muestra, estudiar la posibilidad de que otros marcadores epigenéticos distinto a los grupos metilo estén actuando, probar con diferentes tejidos de la planta o limpiar las matrices MSAP con criterios más exigentes antes de realizar los análisis estadísticos. Todo ello puede constituir material para mis estudios de post-grado con este interesante modelo de estudio.

Conclusiones

- El análisis filogenético basado en marcadores cloroplásticos del árbol concatenado no reveló diferencias entre las poblaciones de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia* por lo que nos permite descartar la posibilidad de que las diferencias entre los dos morfos se deban a diferencias en la secuencia de DNA.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de DNA nuclear de las plantas crecidas en el invernadero de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y *Silene latifolia* subsp. *latifolia*.
- Mediante la técnica MSAP se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre plántulas de las dos especies criadas en invernadero y entre adultos de *Silene latifolia* subsp. *mariziana* y plántulas derivadas de sus semillas en invernadero. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón global de metilación entre adultos reproductores de los dos morfos.
- Las diferencias encontradas en la morfología de las plántulas de ambos morfos criadas en ambiente común, demuestra que la primera generación mantiene las diferencias morfológicas típicas de los adultos.
- En futuros estudios sería necesario utilizar un mayor tamaño muestral y mejorar la aproximación epigenética con técnicas que trabajen locus a locus, probar en diferentes tejidos o utilizar criterios más exigentes para limpiar las matrices MSAP.

Conclusions

- Phylogenetic analyses based on plastid markers did not reveal differentiation between *Silene latifolia* subsp. *mariziana* and *Silene latifolia* subsp. *Latifolia*, so we can rule out the possibility that the differences between the two morphs are due to differences in DNA sequence.
- No statistically significant differences were found in the amount of DNA from *Silene latifolia* subsp. *mariziana* and *Silene latifolia* subsp. *latifolia* grown in the greenhouse.

- The MSAP technique detected statistically significant differences between seedlings of the two species grown in the greenhouse and among adults of *Silene latifolia* subsp. *mariziana* and seedlings derived from their seeds. No statistically significant differences were found in the overall pattern of methylation between reproductive adults of the two morphs.
- The differences found in the morphology of the seedlings of both morphs grown in a common environment, show that the first generation conserve the morphological differences typical of adults.
- In future studies it would be necessary to use a larger sample size and improve the epigenetic approach by using techniques that work locus by locus. In addition to this, tests will have to be run in different tissues or more stringent criteria will have to be applied in order to clean the MSAP matrix.

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la oportunidad que me brindó Alejandro, la colaboración de Marta y la ayuda de Manuel.

A Irene por su infinita paciencia en el laboratorio.

A Carlos M. Herrera por su ayuda en la interpretación de los datos.

Finalmente, gracias a Paloma Morán por acogerme tan cariñosamente en la Universidad de Vigo y permitirme realizar allí una parte de mi TFG.

Bibliografía

- Almeida da Silva, R.M.; Crespi, A.L.; Scilla In Rico, E.; Crespo, M.B.; Quintanar, A.; Herrero, A.; Aedo, C. (2013). *Flora Iberica vol. XX. Liliaceae-Agavaceae*. C.S.I.C. Madrid
- Bonin, A., Bellemain, E.; Bronken, P.; Rompanon, F.; Brochmann, C.; Taberlet, P. (2004). *How to track and assess genotyping errors in population genetics studies*. Molecular Ecology 13: 3261-3273.
- Brothers, A. N.; Weingartner, L. A.; Delph, L. F. (2016). Genetically based population divergence of *Silene latifolia* from two climate regions. Evolutionary Ecology Research, 17, 637-650.
- Castroviejo, S.; Lainz, M.; López, G.; Monserrat, P.; Muñoz, F.; Paiva, J.; Villar, L. (1990). *Flora Ibérica vol. II. Platanaceae-Plumbaginaceae*. C.S.I.C. Madrid.
- Costich, D.E.; Meagher, T.R.; Yurkow, E.J. (1991). *A rapid means of sex identification in Silene latifolia by use of flow cytometry*. Plant Molecular Biology Reporter 9: 359-370.
- Covelo L. (2015). *Papel de la metilación del DNA en el control del desarrollo y la estabilidad genómica en dos especies de peces anádromas (Petromyzon marinus y Salmo trutta)*. (Tesis doctoral) Universidad de Vigo, Vigo, España.
- Crawford, R. (2008). *Plants at the margin*. 1st ed. Cambridge: Cambridge university press.
- Cubas, P.; Vincent, C.; Coen, E. (1999). *An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry*. Nature 104:157-161.
- Doležel, J.; Bartoš, J.; Greilhuber, J. (2003). *Nuclear DNA content and genome size of trout and human* (Letter to the Editor). Cytometry 51A: 127-128.
- Downie S. R.; Katz-Downie D.S.; Cho. K. (1996). *Phylogenetic Analysis of Apiaceae Subfamily Apioideae Using Nucleotide Sequences from the Chloroplast rpoC1 Intron*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 6:1-18.
- Downie S. R.; Katz-Downie D.S. (1999). *Phylogenetic analysis of chloroplast rps16 intron sequences reveals relationships within the Woody wouthern African Apiaceae subfamily Apioideae*. Canadian Journal of Botany. 77: 112–1135

- Fresnedo-Ramírez, J.; Chan, H. M.; Parfitt, D. E.; Crisosto, C. H.; Gradziel, T. M. (2017). *Genome-wide DNA-(de) methylation is associated with Noninfectious Bud-failure exhibition in Almond (Prunus dulcis [Mill.] DA Webb)*. Scientific Reports, 7, 42686.
- Fulneček, J.; Kovařík, A. (2014) *How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles?* BMC Genetics, 15:2.
- Galbraith, D. W.; Harkins, K. R.; Maddox, J. M.; Ayres, N. M.; Sharma, D. P.; Firoozabady, E. (1983). *Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues*. Science 220: 1049-1051.
- Galtier, N.; Gouy, M.; Gautier, C. (1996) *SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny*. Comput. Applic. Biosci., 12, 543-548.
- García, M.; Jáuregui, D.; Medina, E. (2008). *Adaptaciones anatómicas foliares en especies de angiospermas que crecen en la zona costera del estado Falcón (Venezuela)*. Acta Botánica Venezuelica, 31:291-306
- Herrera, C.; Bazaga, P. (2010). *Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet Viola cazorlensis*. New Phytologist 187:867-876.
- Horjales, M.; Laso, G.; Redondo, N. (2008). *Dactylis glomerata L. (Poaceae) en la Península Ibérica*. Nova Acta Científica Compostelana (Biología), 17:65-85.
- Johannes, F.; Porcher, E.; Teixeira, F. K.; Saliba-Colombani, V.; Simon, M.; Agier, N.; Bulski, A.; Heredia, F.; Audigier, A.; Boychez, D.; Dillmann, C.; Guerche, P.; Hospital, H.; Colot, V. (2009). *Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits*. PLoS Genetics, 5(6), e1000530.
- Kilvitis, H.J.; Álvarez, M.; Foust, C.M.; Schrey, A.W.; Robertson, M.; Richards, C. L. (2014) *Ecological Epigenetics*. En Ecological Genomics (pp. 191-210). Springer, Netherlands.
- Linder, R.; García, A. (1997) *Geographic distribution and genetic resources of Dactylis in Galicia (northwest Spain)*. Genetic Resources and Crop Evolution 44: 499–507
- Loureiro, J.; Rodriguez, E.; Doležel, J.; Santos, C. (2007). *Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species*. Annals of botany, 100: 875-888.

- Lüttge M, Kluge, M.; Bauer G. 1993. Botánica. Interamericana-McGraw-Hill. Nueva York
- Maddison, W. P.; Maddison D.R. (2010). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.73. Available from:
<http://mesquiteproject.org>
- Paun, O.; Bateman, R.M.; Fay, M.F.; Hedrén, M.; Civeyrel, L.; Chase, M.W. (2010) *Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae)*. Molecular Biology and Evolution 27: 2465-2473
- Peakall, R.; Smouse P.E. (2012) *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. Bioinformatics 28, 2537-2539.
- Pérez-Figueroa, A. (2013). *Msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data*. Molecular Ecology Resources 13, 522-527.
- Pimentel, M.; Sahuquillo, E.; Catalán, P. (2007). *Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographical history of the European sweet vernal grasses (Anthoxanthum L., Poaceae)*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44:667-684.
- Rambaut A. (2012). FigTree v. 1.4.0 Available from:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rey, O.; Danchin, E.; Mirouze, M.; Blanchet, S. (2016). *Adaptation to Global Change: A Transposable Element-Epigenetics Perspective*. Trends in ecology & evolution, 31:514-526.
- Salemi, M.; Vandamme, A.; Bottu, G. (2009). *The Phylogenetic handbook*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sanmartin, L.A.; Lago, H. (1998) Flora do litoral Galego. Xerais, Vigo.
- Schrey, A. W.; Richards, C. L.; Meller, V.; Sollars, V.; Ruden, D. M. (2012). *The role of epigenetics in evolution: the extended synthesis*. Genetics research international.
- Schrey, A.W.; Álvarez, M.; Foust, C.M.; Kilvitis., H.J.; Lee, J.D.; Liebl, A.L.; Martin L.B.; Richards, C.L.; Robertson, M. (2013) *Ecological epigenetics: beyond MS-AFLP*. Integrative and Comparative Biology 53:340-350
- Scoville, A.G.; Barnett, L.L.; Bodbyl-Roels, S.; Kelly, J.K.; Hileman, L.C. (2011). *Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with*

- transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in Mimulus guttatus*. New Phytol 191: 251–263
- Shaw, J.; Lickey, E. B.; Beck, J. T.; Farmer, S. B.; Liu, W.; Miller, J.; Siripun, K. C.; Winder, C. T.; Schilling, E. E.; Small, R. L. (2005). *The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis*. American journal of botany, 92:142-166.
- Silva, R. A. D.; Rocha, J.; Silva, A.; García-Cabral, I.; Amich, F.; Crespi, A. L. (2014). *The Iberian species of Scilla (subfamily Scilloideae, family Asparagaceae) under climatic change scenarios in southwestern Europe*. Systematic Botany, 39:1083-1098.
- Swofford, D.L. (2000). *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0*. Smithsonian Institution. Washington DC.
- Taberlet P. ; Ludovic G.; Pautou G. ; Bouvet J. (1991). *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*. Plant Molecular Biology 17: 1105-1109
- Tamura K.; Stecher G.; Peterson D.; Filipski A.; y Kumar S. (2013) *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729. Available from:
<http://www.megasoftware.net/>
- Toh, S.S.; Perlin, M.H. (2015). *Size Does Matter: Staging of Silene latifolia Floral Buds for Transcriptome Studies*. International Journal of Molecular Sciences. 16: 22027-22045.
- Weiss-Schneeweiss, H.; Emadzade, K.; Jang, T.-S.; Schneeweiss, G.M. (2013). *Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants*. Cytogenetic and Genome Research. 140(2-4), 137-150.